

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

产品包装

产品编号	产品名称	包装	保存条件
A014-1	Cell Counting Kit-8	1 mL	4°C: 一年 -20°C: 二年
A014-2	Cell Counting Kit-8	5 mL	避光保存

产品概述

Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8 试剂盒, 是一种基于 WST-8 而广泛应用于 细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度、无放射性的比色检测试剂盒。CCK-8 溶液可以直接加入到细胞样品中, 不需要预配各种成分。WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的formazan (参考图 1)。细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 颜色的深浅 (生成的 formazan 量) 和细胞数目呈线性关系。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品, 和 MTT 或其它 MTT 类似产品, 如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。第一, MTT 被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的, 需要有特定的溶剂来溶解; 而 WST-8 和 XTT、MTS 产生的 formazan 都是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤。第二, WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。第三, WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定, 使实验结果更可靠。第四, WST-8 和 MTT、XTT 等相比线性范围更宽, 灵敏度更高, 并且更加稳定。WST-8 对细胞无明显毒性。加入 CCK-8 溶液显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读板, 检测时间更加灵活, 便于确定最佳测定时间。

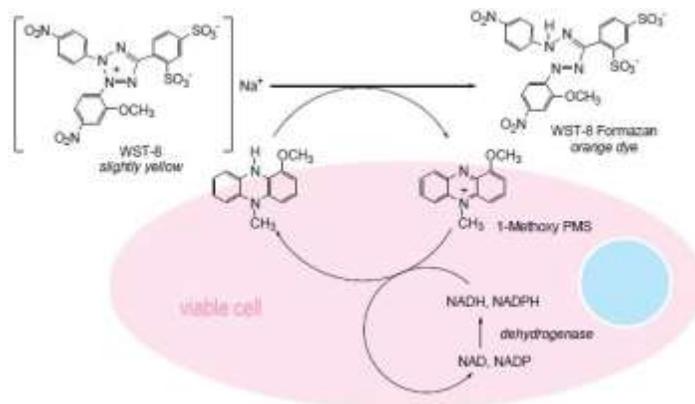


图1. CCK-8 的原理图

操作说明

本试剂盒可以用于细胞因子等诱导的细胞增殖检测, 也可以用于抗癌药物 等对细胞有毒试剂诱导的细胞毒性检测, 或一些药物诱导的细胞生长抑制 检测。

制作标准曲线

1. 先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量, 然后接种细胞;
2. 按比例依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度, 一般要做 5-7 个细胞浓度梯度, 每组 4-6 个复孔;
3. 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁, 然后每 100 μ L 培养基加 10 μ L CCK-8 试剂培养一定时间后测定 OD 值, 制作出一条以细胞数量为横坐标, OD 值为纵坐标的标准曲线。根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数量。使用此标准曲线的前提条件是试验条件完全一致。

细胞活性检测

1. 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔), 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;
2. 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
3. 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
4. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

细胞增殖-毒性检测

1. 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔), 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;
2. 向培养板加入不同浓度的待测药物;
3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间;
4. 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
5. 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
6. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

计算公式

细胞存活率= $[(As-Ab) / (Ac-Ab)] \times 100\%$

抑制率= $[(Ac-As) / (Ac-Ab)] \times 100\%$

As: 实验孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液);

Ac: 对照孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液, 不含药物);

Ab: 空白孔吸光度 (含培养基、CCK-8 溶液, 不含细胞、药物)

注意事项

1. CCK-8 的培养时间一般为 1-4 小时, 但在培养 30 分钟左右即可取出肉眼观察显色程度, 根据细胞种类而定, 需要摸索条件, CCK-8 的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。
2. 使用 96 孔板进行检测时, 如果细胞培养时间较长, 一定要注意蒸发问题。一方面, 由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发, 可以采取弃用周围一圈的办法, 改加相同量的 PBS、水或培养液; 另一方面, 可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方, 以缓解蒸发。
3. 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应, 所以还原剂 (例如一些抗氧化剂) 会干扰检测, 如果待检测体系中存在较多的还原剂, 需设法去除。用酶标仪检测前需确保每个孔内没有气泡, 否则会干扰测定。
4. 加入药物中如含有金属, 对 CCK-8 显色有影响。终浓度为 1 mM 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制 5%、15%、90% 的显色反应, 使灵敏度降低。如果终浓度是 10 mM 的话, 将会 100% 抑制。
5. 培养基中的酚红不会影响实验结果, 酚红的吸光度可以在计算时, 通过扣除空白孔中本底的吸光度而消除, 因此不会对检测造成影响。
6. CCK-8 试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深, OD 值不断增加 (注: 活细胞内的脱氢酶是持续产生的)。
7. 以下方法可以终止 CCK-8 反应 (96 孔板): (a). 在显色反应后, 将培养板放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内。(b). 每孔加 10 μ L 0.1 M HCl 溶液。(c). 每孔加 10 μ L 1% (w/v) 的 SDS (十二烷基硫酸钠) 溶液。注意: 反应停止后, 应在 24 小时内测定。
8. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。